

Simon Zoltán

Gyógyszerfejlesztés polifarmakológián alapuló interakciós profilok segítségével

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Málnási-Csizmadia András

Szerkezeti biokémia program

Biológia Doktori Iskola

Programvezető: Prof. Gráf László

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Budapest

2010

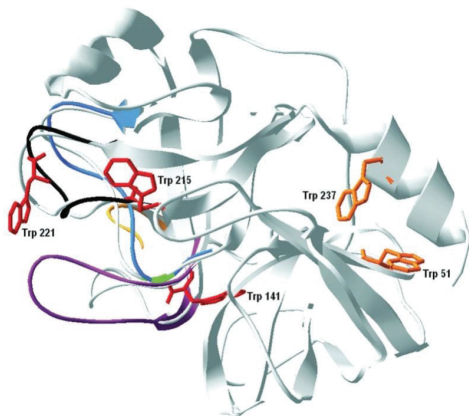
Bevezetés

A korai farmakológiai elméletek a gyógyszer-fehérje kölcsönhatásokat mechanisztikus módon írták le, feltételezve, hogy a gyógyszerek szelektíven hatnak egy-egy specifikus biológiai célpontra (Ehrlich). Mostanra megváltozott a kép: a gyógyszereket egyre inkább komplex biológiai hálózatokat befolyásoló ágenseknek tekintik. A rendszerszemléletű megközelítések egyre nagyobb tért hódítanak, új, holisztikus szemléletet hozva a gyógyszerkutatásba. A polifarmakológia is ilyen felívelőben lévő megközelítés, melynek lényege az a felismerés, hogy a gyógyszerek általában több célfehérjét befolyásolva fejtik ki hatásukat. Ez a nézőpont mindeztidáig nem kapott elegendő figyelmet a gyógyszerfejlesztés során. Ennek következményeként a gyógyszerek és gyógyszerjelölt molekulák bioaktivitási profiljai részlegesen felderítetlenek maradtak. Feltételezésünk szerint a gyógyszerek komplex tulajdonságai – mint amilyen egy *in silico* előállított interakciós mintázat egy sor fehérjével szemben – korrelálnak azok hatásprofiljaival. Ebből következően prediktív erővel rendelkezhetnek, amelynek felhasználásával az eddig fel nem tárt bioaktivitási tulajdonságok előrejelezhetők. Feltételeztük továbbá, hogy az interakciós mintázatban nem kell helyet kapniuk az ismert célfehérjéknek ahhoz, hogy hatékony predikciókat állíthassunk elő. Ezt arra alapoztuk, hogy egy diverz fehérjekészlettel való kölcsönhatási mintázat azt a kölcsönhatási mintázatot mimikálja, amelyet egy gyógyszer testünk valódi fehérjéivel alakít ki, tehát elegendő információt hordoz releváns hatáspredikciók elkészítéséhez.

A fentihez hasonló nézőpontváltás történt korábban egy kisebb, de nem kevésbé bonyolult rendszer esetében is. Emil Fischer idejében a fehérjékre mint statikus objektumokra tekintettek, melyek interakciói más molekulákkal a kulcs-zár elv alapján írhatóak le. Ezzel szemben ma nyilvánvaló, hogy a fehérjék nagyobb flexibilitást mutatnak, mint bármilyen ember alkotta objektum. Munkám második részében a fehérjeflexibilitás komplex problémáját vizsgálom humán 4-es tripszin modellrendszeren. Ennek a fehérjének az aktivációja során a fehérje bizonyos részei, az úgynevezett aktivációs domént alkotó hurkok konformációs változáson mennek át, miközben a fehérje többi része nagyjából változatlan marad. Az aktivációs domént úgynevezett csuklóregiókban elhelyezkedő glicinek határolják; ezek biztosítják a szerkezeti átrendeződés konformációs szabadságát. Munkánkban az aktiváció kinetikai és termodinamikai paramétereit a csuklóregió egyik glicinjének nagyobb oldalláncú aminosavra történő cseréjével befolyásoltuk. Megvizsgáltuk az előállított mutánsok aktivációjának hőmérsékletfüggését és külső (oldat)viszkozitástól való függését, majd a kapott eredményeket Kramers elmélete segítségével értékeltük ki. Ennek alapján

meghatároztunk egy, a fehérje adott konformációs átalakulására vonatkozó flexibilitási paramétert, az úgynevezett relatív belső viszkozitást. Eredményeink azt mutatják, hogy a fehérje flexibilitása a csuklórégióban elhelyezett pontmutációkkal modulálható.

A doktori értekezésemben tanulmányozott két kérdés hasonlóan nagy komplexitású, tehát mindkét esetben redukcióra volt szükség a probléma kezelhető méretűre csökkentése érdekében. A farmakológiai hatások előrejelzésekor komplex gyógyszer-fehérje interakciós mintázatokat és bioaktivitási profilokat kellett korreláltatni, melyek nagy információtömeget jelentettek. A dimenzioredukció és a releváns paraméterek kiválasztása esszenciális volt a kérdés megválaszolásához. Hasonlóképpen, a fehérje flexibilitása majdnem végtelen konformációs teret biztosít. Az értelmezhető méretű probléma megtalálásához mindenképpen szükséges a dimenzioredukció, esetünkben egy fehérje egyszerű konformációs átalakulásának megtalálása, amelyben a modell kismértékű befolyásolásával nagymértékben változtatható a fehérje flexibilitása.



Az ábrán a szarvasmarha tripszinogén és a humán 4-es tripszin egymásra illesztett szerkezete látható (PDB kódok: 1tgn, 1h4w). A humán tripszin 4 aktivációs doménje, melynek konformációja eltér a szarvasmarha tripszinogén (szürke) szerkezetétől, a következő színekkel van kiemelve: a 16-19-es szegmens sárga, a 142-152 lila, a 184-194 kék, a 216-223 pedig fekete. A 193-as

pozíciót, mely nagy szögváltozásokon megy keresztül az aktiváció során, és mely vizsgálatunk tárgyát képezte, zölddel jelöltük. A triptofánok, melyek fluoreszcenciajelet szolgáltathatnak a reakció követéséhez, pirossal vannak kiemelve. A másik két triptofán, melyek mikrokörnyezete nem változik az aktiváció során, narancsszínnel látható.

Célkitűzések

1. Munkám elsődleges célja egy *in silico* predikciós rendszer kifejlesztése, mellyel kismolekulás hatóanyagok bioaktivitási profilja jelezhető előre, a polifarmakológiai paradigmára alapozva.

2. A predikcióhoz használt fehérjekészlet diverzitásának ellenőrzése mellett arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mekkora szerepe van a fehérjések alakjának a kötési affinitásprofilok meghatározásában.

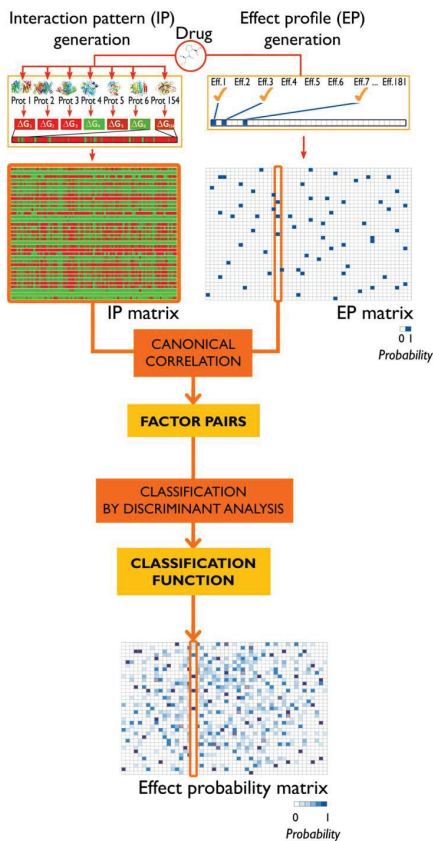
3. Célunk volt továbbá egy különleges szerkezeti átrendeződés, a tripszin aktiváció termodinamikájának vizsgálata és a belső viszkozitás szerepének feltárása a csuklóregióban elhelyezett különböző méretű oldalláncokat tartalmazó tripszinmutánsok segítségével.

4. Annak érdekében, hogy az Arrhenius-ábrázolásból számolt termodinamikai paraméterek pontosságát megnöveljük, egy új, kombinált hőugrásos-megállított áramlásos mérőműszer kifejlesztését céloztuk meg. Ennek segítségével az Arrhenius-ábrázolások kiterjeszthetők a magasabb hőmérsékleti tartomány felé anélkül, hogy a vizsgált fehérje denaturálódna a mérés alatt.

Módszerek

Az interakciós profilok, a hatásprofilok és a fehérjeseb-deszkriptorok összefüggésének vizsgálata

1226 gyógyszermolekulát dokkoltunk 154 fehérjéhez (mindegyiket mindegyikhez) két különböző pontozófüggvény alkalmazásával, és a legalacsonyabb számolt kötési szabadentalpiaértékeket gyógyszerenként sorvektorokba, azaz Interakciós Profilokba (IP) rendeztük. Az IP mátrixot 1226 IP alkotja. A hatásprofilokat (Effektprofil, EP) bináris formában kódoltuk minden gyógyszer esetében (181 hatást vizsgáltunk, meglétüket kék, hiányukat fehér cella jelzi az ábra jobb felső részén). Ezután kanonikus korrelációs analízissel (*Canonical Correlation Analysis*, CCA) generáltunk korreláló faktorpárokat az IP mátrix és minden egyes hatás ujjlenyomata között. Ezek szolgáltatták a bemenetet a lineáris diszkriminanciavizsgálathoz (*Linear Discriminant Analysis*, LDA). Ezáltal osztályozó-függvényeket kaptunk, melyek minden gyógyszer-hatás párra megadnak egy valószínűségi értéket, amelyekből elkészíthető az effektvalószínűségi mátrix (lásd az ábra alján; ez a mátrix folytonos értékeket tartalmaz, szemben az EP mátrixszal). Az osztályozás pontosságát ROC



(Receiver Operating Characteristic) analízissel vizsgáltuk, míg a módszer robusztusságát *leave-one-out* validálással határoztuk meg. A fehérjezsombok alakjának vizsgálatához egy 405 geometriai deskriptorból álló ujjlenyomatot készítettünk minden fehérjéhez. Az átfedés mértékét a geometriai és az IP adatkészlet között kanonikus redundanciaanalízissel (Canonical Redundancy Analysis, CRA) vizsgáltuk. Ugyanezt használtuk szenzitivitásvizsgálatra is, azaz annak meghatározására, hogy az alkalmazott két pontozófüggvény milyen mértékben magyarázza a zsebalakot leíró adatkészletet. Az előállított adatomatrxok komplexitásának vizsgálatát főkomponens-analízissel (Principal Component Analysis, PCA) végeztük el.

Belső viszkozitás: a csuklóregió szerepe a tripszin aktivációja során

Humán tripszinogén 4-est és annak R193G/A/Y/F mutánsait állítottuk elő és pH-ugrással indukált konformációváltozást követtünk a korábban tárgyalt triptofán szenzorok segítségével, *megállított áramlásos* kísérletekben. (A pH-ugrás az aktivációval azonos konformációváltozást indukál.) A szerkezeti átrendeződés hőmérsékletfüggését konvencionális készülékkel vizsgáltuk 5-38 °C között, míg a 34-60 °C-os tartományban az újonnan kifejlesztett *hőugrásos-megállított áramlásos* berendezést használtuk. Az aktiváció sebességi állandójának relatív külső viszkozitástól való függését 20 °C-on mértük maltózt tartalmazó pufferek alkalmazásával, ezáltal 1-től 8,18-ig terjedő relatív viszkozitású oldatokat kaptunk. Adatainkat az Ansari és munkatársai által módosított Kramers-elmélet segítségével értékeltük. Eszerint az Arrhenius-féle preexponenciális tag egy súrlódási paramétert tartalmaz,

ami két forrásból eredeztethető: az egyik a külső (oldat)viszkózitás, a másik pedig egy belső, viszkozitás jellegű tulajdonság (noha ez nem általánosan jellemző, mint az oldat viszkozitása, hanem mindig egy bizonyos konformációs átrendeződést jellemez). A modell szerint a konformációváltozás sebessége fordítottan arányos a külső viszkozitással.

A hőugrásos-megállított áramlásos berendezés elve

A konvencionális megállított áramlásos műszerben két fő módosítást hajtottunk végre. Mindenelőtt egy fűtőhurkot illesztettünk az egyik reaktánsot tartalmazó fecskendő és a keverőkamra közé. A fecskendő szobahőmérsékletűre vannak temperálva. Lövés hatására a nem hőérzékeny reaktáns áthalad a fűtőhurkon, és a későbbi mérési hőmérsékletnél magasabb hőmérsékletet ér el. Ezután találkozik a szobahőmérsékletű reaktánssal (általában az enzimmel), és a keverőkamrában létrejön az új, kevert hőmérsékletű oldat – ekkor történik a tulajdonképpeni hőugrás. Ez a keverék kerül a küvetába, ahol a reakció előrehaladása detektálható. A küvetaház arra a hőmérsékletre van kalibrálva, ami a két oldat keveredésekor beáll (ez a mérési hőmérséklet). Ha ez a két érték nem egyezne meg, a küvetában hőmérsékleti kiegyenlítődés történne, ami a reakció követésére használt jel perturbálásához vezet, ezért fontos a rendszer kalibrációja.

Eredmények

1. Előállítottuk az IP mátrixot, mely 1226 gyógyszer és 154 fehérje interakciós adatait tartalmazza, AutoDock4 és X-SCORE pontozófüggvények alkalmazásával. Létrehoztuk az EP mátrixot, mely 181 bit hosszúságú bináris ujjlenyomatokban kódolja az 1226 szer vizsgált hatásait. A fehérjezsebek geometriájának leírására egy újabb adatbázist készítettünk, mely fehérjénként 405 deszkriptort tartalmaz.

2. Az alkalmazott fehérjekészlet diverzitásának megállapítására és a zsebalak jelentőségének vizsgálatára a MAF mátrixot (a transzponált IP mátrix, mely nem a gyógyszereket, hanem a fehérjéket kezeli megfigyelésekként) és a geometriai deszkriptorok mátrixát PCA, CCA és CRA vizsgálatoknak vetettük alá. Megállapítottuk, hogy a fehérjekészlet zsebalak tekintetében megfelelő diverzitást mutat. A MAF és a geometriai mátrix PCA analiziséből kiderült, hogy az előbbi jóval nagyobb komplexitást mutat. A CCA három statisztikailag szignifikáns faktorpárt tárt fel, rendre 0,87, 0,84 és 0,77-es korrelációs együtthatókkal. A CRA alapján a geometriai deszkriptorok főkomponensei a MAF

faktorkészlet varianciájának 6,9%-át magyarázzák, míg MAF faktorok a geometriai adatok 15,9%-át. A kanonikus faktorpárok szerkezetének analizisével egyértelmű összefüggéseket tártunk fel a gyógyszermolekulák alakja és a zsebdeszriptorok között.

3. A különböző pontozófüggvények hasonló affinitási mintázatot hoztak létre a zsebdeszriptorokkal mutatott korreláció tekintetében. Ezenkívül nagy korrelációt tudtunk kimutatni a két pontozófüggvénnyel előállított IP mátrix között.

4. Egy egydimenziós elemzés segítségével, mely egyszerű IP-vektorhasonlósági számításon alapszik (két IP-vektor által bezárt szögön), egyértelmű kapcsolatot mutattunk ki a gyógyszermolekulák IP-je és EP-je között: hasonló IP-vel rendelkező molekulák bioaktivitási profilja is hasonlóan bizonyult.

5. A kapott összefüggést megvizsgáltuk egy olyan adatkészleten is, mely nem tartalmazta egyetlen ismert célfehérje adatait sem, és az előzőekkel azonos eredményeket kaptunk.

6. Módszerünk lehetővé teszi a bioaktivitási profilok hasonlóságainak nagy hatékonyságú felderítését abban az esetben is, ha a vizsgált kismolekulák között szerkezeti hasonlóság nem áll fenn, amint azt több esettanulmányunk is bizonyítja.

7. Az előzőekben feltárt IP-EP kapcsolat kvantifikálása CCA-val és LDA-val történt, melyeket a teljes IP mátrix és az EP mátrix minden egyes effektje között végeztünk el (ezen sokdimenziós eljárásunk neve Gyógyszerprofil-összevetés). A kapott osztályozófüggvények pontosságát ROC analízissel vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy a vizsgált hatások 82%-a 0,95-nél nagyobb AUC értékkel jellemezhető. Ez a mérőszám az osztályozás pontosságát mutatja, maximális értéke 1; következésképpen osztályozófüggvényeink kiemelkedő pontosságúak. *Leave-one-out* validációval megállapítottuk, hogy osztályozófüggvényeink átlagosan 25-ször jobban teljesítenek, mint egy random osztályozás.

8. Az egyes osztályozófüggvényekben szereplő célfehérjék kanonikus súlyának vizsgálatával megállapítottuk, hogy az osztályozásban betöltött fontosságuk nem nagyobb, mint a többi fehérjéé. Ez összhangban van az 5. pont megállapításaival.

9. Bizonyos predikcióinkat retrospektív irodalmi analízissel, valamint *in vitro* és sejtenyészetes tesztekkel ellenőriztük. Pontossági és robusztussági (validációs) értékeik figyelembevételével az ACE-gátló és COX-gátló hatásokra kapott predikcióinkat választottuk ki *in vitro* tesztelésre. A jóslások több mint 50%-át sikeresen visszaigazoltuk. Ezenkívül két molekula esetében sejtenyészeten ellenőriztük a hozzájuk jóslott adrenerg és dopaminerg profilt, amit szintén sikerült visszaigazolni.

10. A belső viszkozitásnak a humán tripszin 4 aktivációjában betöltött szerepét kutató termodinamikai vizsgálatunkban megállapítottuk, hogy az R193G/A/Y/F mutánsok

szignifikánsan különböznek az Arrhenius-féle preexponenciális tagban, ám a bevitt mutáció nem változtatta meg a reakció aktivációs energiáját. (Tehát az Arrhenius-ábrázolások minden konstrukció esetében párhuzamosak.)

11. A konformációváltozás sebességének külső viszkozitástól való függését is megvizsgáltuk a vad típusú tripszin és az R193G és R193A mutánsok esetében. Megállapítottuk, hogy a reakciósebesség fordítottan arányos az oldat viszkozitásával.

12. A fenti jelenséget a Kramers-egyenlettel interpretáltuk és meghatároztuk a három tripszinkonstrukció relatív belső viszkozitását a vizsgált konformációváltozásra nézve ($\sigma_{R193G}=0.27$, $\sigma_{R193A}=0.81$, $\sigma_{vad}=1.67$). Megállapítottuk, hogy a csuklórégióban elhelyezett nagyobb méretű oldallánc kisebb konformációs szabadságot biztosít a peptidgerincnek az aktiváció során, szemben az oldallánccal nem rendelkező glicinnel. Ez eredményezi a belső viszkozitás értékének növekedését.

13. Felépítettünk egy új, kombinált hőugrásos-megállított áramlások berendezést. A fűtőhurkot és a küvettaház fűtését a fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének segítségével kalibráltuk, mindkét fecskendőbe ugyanazt a fluoreszcens reaktánszt töltve. Ebben az esetben keveredés hatására csak akkor tapasztalunk jelváltozást, ha a küvettaiba érkező keverék és a küvetta hőmérséklete eltérő. Ennek alapján hőmérsékletpárokat határozunk meg a mérési tartományban.

14. Meghatároztuk a készülék holtidejét (ami a keverőkamra és a küvetta, tehát a reakció kezdete és a detektálás kezdete közötti idő), és megállapítottuk, hogy az megegyezik a módosítás nélküli készülék holtidejével (0,9 ms).

Következtetések

Doktori munkámban két komplex problémát érintettem. Először egy új megközelítést mutattam be, melynek segítségével gyógyszerek hatásprofiljai jelezhetők előre. Ezután a fehérjeflexibilitás kérdését vizsgáltam, és meghatároztam a belső viszkozitás értékét egy specifikus konformációs átmenetre. A használt metodika eltérő volt a két esetben, de ugyanazzal az elméleti problémával talákoztunk: a komplexitás kezelésével és azzal a kihívással, amint a rendszer releváns tulajdonságainak kiválogatása jelent.

1. Egydimenziós és sokdimenziós analízisekkel szoros összefüggést tártunk fel az IP-k és az EP-k között. Bebizonyítottuk, hogy a célfehérjék nem szükségesek a hatékony hatás-előrejelzéshez. Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, amely közvetlenül kapcsol össze két távoli információs szintet, az atomi kölcsönhatásokat a fiziológiai hatásokkal. A

feltárt kvantitatív korrelációk alapján a létező gyógyszerek új, eddig rejtett hatásai azonosíthatók, és lehetőség nyílik a szerek teljesebb hatásprofiljának feltárására. A módszer pontosságát és robusztusságát a statisztikai módszereken túl sikeres *in vitro* tesztekkel is bizonyítottuk. Megközelítésünk predikciós ereje lehetőséget ad annak alkalmazására a gyógyszerfejlesztésben és a már piacon lévő szerek vizsgálatában is.

2. A kötőzsebek geometriájának vizsgálata során megállapítottuk, hogy bizonyos specifikus eseteket nem számítva a zsebalaknak viszonylag kis súlya van a fehérjék affinitási profiljainak meghatározásában. Mivel a MAF profil összefügg a kötőzsebek specifikusával, megállapíthatjuk, hogy a zsebalak nem meghatározó tényező a gyógyszer-célpontok kiválasztásában. Mindazonáltal néhány erős, egyedi asszociáció alapján elmondhatjuk, hogy a zsebalaknak nagy jelentősége van olyan gyógyszer-csoportoknál, mint pl. a morfinszármazékok, a benzodiazepinek vagy a barbiturátok. Ebből következően az alakon alapuló gyógyszertervezésnek nagyobb hatékonysága lehet az effajta gyógyszerek esetében, mint más gyógyszer-csoportoknál.

3. Dolgozatomban a belső viszkozitás szerepét is megvizsgáltam, humán 4-es tripszin modellrendszer alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a csuklórégióban elhelyezett, nagyobb oldalláncú mutánsok az oldallánc méretének növekedésével az aktiváció sebességi állandója csökken. Adataink azt mutatják, hogy a mutációk nem befolyásolják az aktiválási energiát, viszont szignifikánsan hatnak a preexponenciális tagra. A vad típusú humán tripszin 4 és két mutánsa esetében tanulmányoztuk az oldószer-viszkozitás hatását az aktivációra. Az eredményeket Kramers szerint értelmeztük, és meghatároztuk a belső viszkozitás értékét erre a három konstrukcióra. Megállapítottuk, hogy a tanulmányozott konformációváltás sebességét a belső súrlódás szabályozza, amit a csuklórégióban elhelyezett specifikus mutációkkal befolyásolhatunk. Eredményeink a belső viszkozitás hőmérsékletfüggésének vizsgálatával egy új tudományos modell alapját képezhetik, mely megmagyarázhatja az enzimreakciók belső viszkozitásának fizikai hátterét.

4. A vad típusú és a mutáns tripszinek aktivációjának termodinamikai karakterizálásakor vizsgált hőmérséklettartomány kiterjesztésére kifejlesztettünk és kalibráltunk egy új hőugrásos-megállított áramlások berendezést. A módszer fő előnye, hogy a hőugrás a reaktánsok gyors keveredésével egyidőben történik meg, így a keverés és a hőugrás holtideje azonos (megfelelő kalibráció esetén). Így minden olyan reakció vizsgálhatóvá válik, amely gyorsabb, mint a termikus denaturáció.

Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok:

1. Zoltán Simon, Margit Vigh-Smeller Ágnes Peragovics, Gábor Csukly, Gergely Zahoránszky-Kóhalmi, Anna Á Rauscher, Balázs Jelinek, Péter Hári, István Bitter, András Málnási-Csizmadia, Pál Czobor: **Relating the shape of protein binding sites to binding affinity profiles: is there an association?**
BMC Struct Biol 2010, **10**:32.

2. Júlia Tóth*, Zoltán Simon*, Péter Medveczky, Linda Gombos, Balázs Jelinek, László Szilágyi, László Gráf, András Málnási-Csizmadia: **Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal viscosity in protein dynamics.**
Proteins 2007, **67**(4):1119-1127.

*egyenlő hozzájárulás

3. Bálint Kintses, Zoltán Simon, Máté Gyimesi, Júlia Tóth, Balázs Jelinek, Csaba Niedetzky, Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia: **Enzyme kinetics above denaturation temperature: a temperature-jump/stopped-flow apparatus.**
Biophys J 2006, **91**(12):4605-4610.

Egyéb közlemények:

1. Zahoránszky Gergely, Simon Zoltán, Zhenhui Yang, Hári Péter, Málnási-Csizmadia András: „MIF: a gyógyszerkutatók új korszakának hírnöke” *Biokémia*, XXXII. évf., 4. szám (2008), Budapest, Magyarország
2. Simon Zoltán, Zahoránszky Gergely, Zhenhui Yang, Jelinek Balázs, Hetényi Csaba, Hári Péter, Bitter István, Málnási-Csizmadia András: „Gyógyszerhatások előrejelzése molekuláris interakciók ujjlenyomat segítségével” Előadás a Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi Vándorgyűlésén (2008), Szeged, Magyarország
3. Rauscher Anna, Simon Zoltán, Gráf László, Málnási-Csizmadia András: „A konformációváltozás során fellépő belső súrlódás hőmérsékletfüggése a humán tripszin 4 modellrendszerben” Előadás a Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi Vándorgyűlésén (2008), Szeged, Magyarország
4. Zoltán Simon, Júlia Tóth, Péter Medveczky, Linda Gombos, Balázs Jelinek, László Szilágyi, László Gráf, András Málnási-Csizmadia: “Site Directed Mutagenesis at Position 193 of Human Trypsin 4 Alters the Rate of Conformational Change during Activation: Role of Local Internal Viscosity in Protein Dynamics” Előadás, IV. International Conference on Molecular Recognition (2007), Pécs, Magyarország
5. Simon Zoltán: „Molekuláris Interakciók Ujjlenyomat: Új megközelítés a gyógyszertervezésben” Előadás a Magyar Biokémiai Egyesület IV. Vándorgyűlésén (2006), Pécs, Magyarország